

INFORME BREVE

Evaluación de la transmisión galactógena de *Trichinella patagoniensis* en ratones BALB/c



Fernando A. Fariña^{a,b,*}, Mariana I. Pasqualetti^a, Natalia M. Cardillo^{a,b},
Tatiana Aronowicz^a, Mariano Ercole^a, Silvio J. Krivokapich^c y Mabel M. Ribicich^a

^a Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires (FCV-UBA), CABA, Argentina

^b Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), CABA, Argentina

^c Departamento de Parasitología, INEI, ANLIS, «Dr. Carlos Malbrán», CABA, Argentina

Recibido el 11 de noviembre de 2015; aceptado el 25 de febrero de 2016

Disponible en Internet el 15 de abril de 2016

PALABRAS CLAVE

Transmisión vertical;
Trichinella
patagoniensis;
Trichinellosis
congénita;
BALB/c

KEYWORDS

Vertical transmission;
Trichinella
patagoniensis;
Congenital
trichinellosis;
BALB/c

Resumen Desde 1916 se sospecha que la transmisión vertical de parásitos del género *Trichinella* podría ocurrir en mujeres embarazadas o lactantes durante la fase parenteral de la infección. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la transmisión galactógena de *T. patagoniensis* en ratones BALB/c. Se utilizaron 20 ratones que se dividieron en 2 grupos de 10 individuos, según el momento de la gestación en que fueron infectados, 15 o 18 días después de detectar el tapón mucoso. Cada grupo se subdividió a su vez en 2 subgrupos, los que recibieron una dosis oral de 100 o de 500 larvas infectantes, respectivamente. Se procedió a la eutanasia y posterior digestión artificial de las crías y de las madres. No se encontraron larvas L1 de *T. patagoniensis* en ninguna de las crías analizadas. Estos resultados indican que no habría transmisión galactógena de *T. patagoniensis* en ratones BALB/c.

© 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la CC BY-NC-ND licencia (<http://creativecommons.org/licencias/by-nc-nd/4.0/>).

Assessment of transmammary transmission of *Trichinella patagoniensis* in BALB/c mice

Abstract Since 1916 to date, it has been suspected that vertical transmission of parasites from the genus *Trichinella* could occur in pregnant or lactating women during the parenteral phase of infection. The aim of the present study was to evaluate the transmammary transmission of *T. patagoniensis* in BALB/c mice. Twenty 7-week-old BALB/c mice were distributed into two groups of 10 individuals each, depending on the time of gestation when they were infected, 15 or 18 days after detection of the vaginal plug. Each group was subdivided into two subgroups of 5 mice each, which were given an oral dose of 100 or 500 infective larvae respectively.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: fernandoaf@vet.uba.ar (F.A. Fariña).

Euthanasia and subsequent artificial digestion was performed in the pups and the dams. No *T. patagoniensis* L1 larvae were found in any of the offsprings analyzed. The observed results suggest that vertical transmission of *T. patagoniensis* would not be possible in BALB/c mice. © 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

La trichinellosis es una zoonosis transmitida por consumo de alimentos que contienen el parásito *Trichinella* spp. En Argentina la enfermedad es endémica y principalmente transmitida por cerdos. Fue esta una enfermedad reemergente en el período 1990-2005. El número de personas infectadas entre los años 2008 y 2010 fue de 417. Durante el año 2013, se notificaron 1.159 casos humanos de esta enfermedad¹¹.

Durante años, la única especie involucrada en brotes humanos y focos porcinos en Argentina fue *Trichinella spiralis*. Sin embargo, en 2008 Krivokapich et al.⁶ reportaron la presencia de un nuevo genotipo de *Trichinella* en un puma de montaña (*Puma concolor*) en la provincia de Río Negro, Argentina. Este nuevo genotipo hoy es una nueva especie encapsulada: *Trichinella patagoniensis*⁶. Estudios experimentales con esta nueva especie demostraron que los felinos y los ratones son los animales más susceptibles de adquirir la infección, mientras que los cerdos y las ratas presentan una carga parasitaria muy baja^{6,12}. Por otro lado, en las aves domésticas, representadas por *Gallus gallus domesticus*, la infección no se desarrolla más allá del intestino¹¹.

Debido a su reciente hallazgo, los conocimientos respecto de la biología de esta nueva especie aún son escasos.

La transmisión vertical de helmintos es universalmente materna y se manifiesta a través de mecanismos prenatales o galactógenos¹³. Diversos nematodos parásitos son capaces de emplear esta estrategia como mecanismo de perpetuación de su especie. En 1916 se sugirió por primera vez la existencia de la transmisión vertical de *Trichinella* spp., producto del hallazgo de un gran número de larvas en la leche de una mujer que se encontraba lactando¹³. Desde ese entonces, se sospecha que la transmisión vertical de parásitos del género *Trichinella* podría ocurrir en mujeres embarazadas o lactantes durante la fase parenteral de la infección. Luego de un brote de trichinellosis en la provincia de Udomxay, de la República Democrática Popular de Laos, Taybouavone et al. realizaron un estudio de casos y controles, y no pudieron demostrar la transmisión de *Trichinella* spp. desde las madres hacia sus hijos¹⁴.

Dubinsky et al. publicaron en 2001 el hallazgo de larvas y partes de larvas en la placenta, el contenido de las cavidades corporales, los órganos y los tejidos fetales provenientes de una mujer que resultó infectada en la semana 10 de la gestación, y que decidió practicar el aborto en la semana 22 de gestación, durante un brote por *Trichinella britovi* que tuvo lugar en 1998 en la República Eslovaca³.

Si bien la infección por parásitos del género *Trichinella* en la mayoría de los casos responde a mecanismos de

transmisión horizontal (por consumo de tejido muscular con larvas viables), distintos autores han demostrado que es factible la transmisión vertical en ratas, cobayos, ratones y hurones^{1,2,8,15}.

Dado que esta ruta de transmisión alternativa no solo es importante en animales, sino también en seres humanos, se hace necesario su estudio en esta nueva especie. La placenta del ratón y del humano exhiben características anatómicas semejantes, ambas son hemocoriales, lo que significa que el tejido trofoblástico derivado del feto se encuentra bañado directamente por la sangre materna.

Considerando la susceptibilidad del ratón a la infección por *T. patagoniensis*, su corto período generacional y la semejanza de su placenta con la del ser humano, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la presencia de larvas L1 de *T. patagoniensis* en las crías de ratones BALB/c infectados experimentalmente en los días 15 y 18 de preñez.

Se empleó una cepa de *T. patagoniensis* que había sido tipificada previamente⁶, proveniente de un puma de montaña (código ISS2311) mantenida en ratones BALB/c en la Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires (FCV-UBA).

Se emplearon 20 ratones hembra BALB/c de 7 semanas de edad, provenientes del Bioterio Central de la FCV-UBA. Los animales fueron divididos en 2 grupos de estudio de 10 individuos cada uno de acuerdo con el día de preñez en el que serían inoculados. Las hembras se alojaron de a una por jaula con un macho y fueron observadas 2 veces por día para verificar la presencia de tapón mucoso vulvar y una vez por día para observar la distensión abdominal. Se consideró la aparición del tapón mucoso como el día 1 de la preñez⁴. Los machos fueron retirados de las jaulas ante la evidencia del tapón mucoso. El grupo n.º 1 fue inoculado a los 15 días de aparecido el tapón y el grupo n.º 2 a los 18 días de aparecido el tapón mucoso. Cada grupo fue dividido en 2 subgrupos de 5 animales, que fueron inoculados por vía oral con 100 o con 500 larvas de *T. patagoniensis*, respectivamente. Para preparar el inóculo de larvas para las hembras gestantes, se utilizó la técnica de digestión artificial. Se realizó la eutanasia de 2 ratones BALB/c que habían sido previamente inoculados con 500 larvas de *T. patagoniensis* cada uno. Cada carcasa y lengua se lavó con agua corriente, se secó con papel absorbente, se cortó con tijera en trozos de aproximadamente 2 × 2 cm y se procesó en un procesador tipo familiar. El producto cárnico obtenido fue pesado para calcular el volumen de la solución de digestión (pepsina 1:10.000 1% P/V y ácido clorhídrico 1% V/V) necesario para

Tabla 1 Carga parasitaria en madres BALB/c inoculadas con larvas L1 de *Trichinella patagoniensis*

Tiempo de gestación al inocular (días)	Dosis infectiva (n.º de larvas)	Carga parasitaria (LPG ^a)
15	100	113,21 ± 44,60
	500	1.230,40 ± 396,98
18	100	157,70 ± 62,68
	500	1.452,88 ± 451,05

^a LPG: carga parasitaria muscular relativa expresada como número de larvas por gramo de tejido fresco a los 48 días pos infección. Se indica la media ± desvío estándar de cada subgrupo (n = 5).

liberar las larvas enquistadas. La mezcla ratón-solución de digestión se colocó en un vaso sobre un agitador magnético y se incubó a 37 °C, con agitación suave hasta su total digestión. Se coló con colador de malla metálica de 80 *meshes* y se dejó sedimentar 30 min. Luego se aspiró el sobrenadante hasta dejar 10 ml y se dejó reposar durante 20 min. Se realizaron reducciones volumétricas del 50 %, se retiró el sobrenadante y se efectuó el conteo tomando 5 alícuotas de 50 µl entre porta y cubre en un microscopio óptico con un aumento de 10×⁵.

Se realizó el seguimiento de las preñeces. Luego de nacidas, las crías se mantuvieron con las madres hasta el día 21, momento en el que se realizó el destete. A los 30 días de vida, se realizó la eutanasia de las crías.

Las madres fueron sacrificadas 48 días postinoculación. Se realizó digestión artificial⁵ de cada una de las crías y de cada una de las madres. Se utilizó el método físico de eutanasia, la técnica de dislocación cervical manual. Previo a la dislocación, se inyectó a cada animal por vía intraperitoneal una solución de 60 mg/kg de ketamina y 6 mg/kg de xilacina⁷. Una vez digeridas las crías y las madres, se estimó el grado de infección alcanzado por cada ratón determinando la carga parasitaria muscular por recuento de larvas en músculo, según la técnica descrita por Kapel y Gamble⁵ modificada. Se procesó la carcasa de cada animal empleando la misma metodología descrita anteriormente. El resultado se expresó como carga parasitaria muscular relativa, que se calculó como el número de parásitos recuperados por gramo de tejido fresco (LPG).

Las hembras BALB/c infectadas durante la gestación no evidenciaron signos compatibles con trichinellosis, el parto de todas ellas fue normal, sin complicaciones (distocias). Las preñeces tuvieron una duración promedio de 18 ± 2 días. No se encontraron larvas L1 de *T. patagoniensis* en ninguna de las crías analizadas. Los resultados del análisis por medio de la técnica de digestión artificial de las madres se resumen en la [tabla 1](#).

El estudio demostró que si bien las madres adquirieron la infección por *T. patagoniensis* con ambas dosis (100 y 500 larvas) inoculadas en los días 15 o 18 de la preñez ([tabla 1](#)), ninguna cría fue capaz de hospedar larvas L1 en sus músculos. Esto concuerda con lo publicado por Cui et al.², quienes no hallaron evidencia de transmisión vertical de *T. spiralis* en crías de ratones BALB/c nacidas de madres infectadas en los días 15 o 17 (último tercio de la gestación). En este sentido, cabe destacar que tanto en la experiencia de Cui et al.² como en la presente, las infecciones experimentales se llevaron a cabo en momentos similares y con la misma cepa de ratón. La ausencia de transmisión galactógena podría deberse, en parte, a la mayor expresión de interleucina-2 en

el intestino delgado de este tipo de ratón, lo que favorecería la expulsión de parásitos del género *Trichinella*⁹.

Matenga et al.⁸ reportaron la transmisión experimental de *T. zimbabwensis* por la vía galactógena en *Rattus norvegicus*, al realizar la inoculación 40 días antes de la concepción. Estos resultados contrastan con los obtenidos en el presente trabajo, pero cabe señalar que tanto la especie animal como el momento de la infección son diferentes.

Las distintas especies animales no presentan la misma capacidad de transmisión vertical de *Trichinella* spp. Cosoroaba y Orjanu¹, Webster y Kapel¹⁵ y Cui et al.² encontraron larvas infectantes de *T. spiralis* en las crías de hurones, cobayos, ratones CF1, BALB/c y ratas que habían sido infectados de forma experimental, antes o inmediatamente después de la concepción, lo que indica que la transmisión vertical ocurriría por un pasaje transplacentario de larvas. En la infección por *T. patagoniensis*, la ausencia de recuperación de larvas en crías provenientes de hembras inoculadas en gestación tardía no descartaría la posibilidad de transmisión transplacentaria, lo que refuerza la necesidad de intensificar los estudios al respecto.

Cabe destacar que *T. spiralis*, a diferencia de *T. patagoniensis*, posee una patogenicidad mayor debido a su alto índice de capacidad reproductiva (RCI) y a la reacción inmunológica que desencadena en el hospedador¹⁰. Esto podría ser una explicación, en parte, al hecho de que no haya habido transmisión de larvas hacia las crías. Al tener un RCI mayor (*T. spiralis*), la producción de larvas recién nacidas (LRN) por hembra sería mayor, lo que incrementaría las chances de que a una misma dosis de infección *T. spiralis* pueda transmitirse hacia las crías y *T. patagoniensis* no.

Además de la diferencia en la patogenicidad, también son fundamentales para explicar esta situación las cargas larvianas utilizadas. En este trabajo, se emplearon 2 cargas larvianas (una baja y otra media) con el objeto de simular una situación que ocurre en la naturaleza. Por el contrario, en los trabajos realizados por otros grupos de investigación se emplearon cargas muy superiores^{1,2,8,15}.

En conclusión, a partir de los resultados obtenidos no sería factible la transmisión galactógena de *T. patagoniensis* en el ratón BALB/c, es decir, que esta vía no desempeñaría un papel en la transmisión y la perpetuación de este parásito.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a

las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki. El presente estudio experimental fue aprobado bajo el número 2014/01 por el Comité para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la FCV-UBA.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación

Este trabajo fue financiado por los proyectos MINCyT PICT 2013-0965 y UBACyT 20020130100336BA.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Cosoroaba I, Orjanu N. Congenital trichinellosis in the rat. *Vet Parasitol.* 1998;77:147–51.
2. Cui J, Wang ZQ, Han HM. Congenital transmission of *Trichinella spiralis* in experimentally infected mice. *Helminthologia.* 2006;43(1):7–10.
3. Dubinsky P, Boor A, Kinceková J, Tomasovica O, Reiterova K, Bielik P. Congenital trichinellosis. Case report. *Parasite.* 2001;8:180–2.
4. Freyre A, Falcón J, Méndez J, Rodríguez A, Correa L, González M. Refinement of the mouse model of congenital toxoplasmosis. *Exp Parasitol.* 2006;113:154–60.
5. Kapel CMO, Gamble HR. Infectivity, persistence, and antibody response to domestic and sylvatic *Trichinella* spp. in experimentally infected pigs. *Int J Parasitol.* 2000;30:215–21.
6. Krivokapich SJ, Pozio E, Gatti GM, Gonzalez Prous CL, Ribicich MM, Marucci G, la Rosa G, Confalonieri V. *Trichinella patagoniensis* n. sp. (Nematoda), a new encapsulated species infecting carnivore mammals in South America. *Int J Parasitol.* 2012;42:903–10.
7. Leary S, Underwood W, Anthony R, Cartner S, Corey D, Grandin T, et al. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition; 2013. [consultado 1 Nov 2015]. Disponible en: <https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>
8. Matenga E, Mukaratirwa S, Bhebe E, Willingham A. Evidence of congenital and transmammary transmission of *Trichinella zimbabwensis* in rats (*Rattus norvegicus*) and its epidemiological implications. *Int J Appl Res VetMed.* 2006;4(4):307–12.
9. Pemberton AD, Knight PA, Gamble J, Colledge WH, Lee JK, Pierce M, Miller HR. Innate BALB/c enteric epithelial responses to *Trichinella spiralis*: Inducible expression of a novel goblet cell lectin, intelectin-2, and its natural deletion in C57BL/10 mice. *J Immunol.* 2004;173(3):1894–901.
10. Pozio E, Zarlenga DS. Recent advances on the taxonomy, systematics and epidemiology of *Trichinella*. *Int J Parasitol.* 2005;35:1191–204.
11. Pasqualetti M, Fariña F, Falzoni E, Cardillo N, Aronowicz T, Krivokapich S, Rosa A, Ribicich M. Susceptibility of chickens (*Gallus gallus domesticus*) to *Trichinella patagoniensis*. *Vet Parasitol.* 2014;205(1-2):397–400.
12. Ribicich M, Krivokapich S, Pasqualetti M, Gonzalez Prous CL, Gatti GM, Falzoni E, Aronowicz T, Arbusti P, Fariña F, Rosa A. Experimental infection with *Trichinella* T12 in domestic cats. *Vet Parasitol.* 2013;194:168–70.
13. Shoop WL. Vertical transmission of helminths: Hypobiosis and amphiparatenesis. *Parasitology.* 1991;7:51–4.
14. Taybouavone T, Hai TN, Odermatt P, Keoluangkhot V, Delanos-Gregoire N, Dupouy-Camet J, Strobel M, Barennes H. Trichinellosis during pregnancy: A case control study in the Lao Peoples' Democratic Republic. *Vet Parasitol.* 2009;159:332–6.
15. Webster P, Kapel CMO. Studies on vertical transmission of *Trichinella* spp. In experimentally infected ferrets (*Mustela putorius furo*), foxes (*Vulpes vulpes*), pigs, guinea pigs and mice. *Vet Parasitol.* 2005;130:255–62.